

# 鉄欠乏に伴うラットヒラメ筋における $\beta$ - 受容体分布の変化

鹿屋体育大学助教授	大	平	充	宣
	安	井		渉
	刈	谷	文	彦
	開	発	健	一
	田	中	隆	人
鹿児島大学医学部第一内科	末	次	哲	朗
日本女子体育大学教授	黒	田	善	雄

鉄欠乏は、血中ヘモグロビン (Hb) 量の低下を起こすだけでなく、組織における鉄含有タンパク質の合成も抑制する。しかし、筋中の高エネルギーリン酸含有量が低下するくらい鉄欠乏が強度に進行すると、非鉄含有酵素が活性化されると報告されている(1)。又、鉄欠乏とは無関係に、寒冷暴露(2)やクレアチンアナログである  $\beta$ -guanidinopropionic acid ( $\beta$ -GPA) の経口投与(3-6)などにより、高エネルギーリン酸レベルが低下した筋でも、ミトコンドリア酵素活性の上昇が認められている。このような結果は、筋中の高エネルギーリン酸レベルが長期間低下すると、それを合成するためのエネルギー代謝が刺激され、代償的な変化が起こることを示唆するものである。骨格筋における  $\beta$ -受容体分布は、ミトコンドリア酵素活性の高い筋ほど密であるという報告もあるが(7,8)、そのメカニズムは明らかでない。そこで、本研究では、骨格筋  $\beta$ -受容体は鉄欠乏によりどう影響されるのか検討した。又、高エネルギーリン酸レベルが変わるように鉄欠乏の程度に差を生じさせ、ミトコンドリア酵素の比活性値を種類によって変えた場合の  $\beta$ -受容体の反応を調べることにより、ミトコンドリア機能の何と密に関係して変化するのか検討した。

## 方 法

3週齢Wistar系雄ラットを任意に次の3群に分けた；1) 2 ppm Fe群 (170365, Teklad, Madison, WI, USA)、2) 6 ppm Fe群 (TD 77346, Teklad, 3) 100ppm Fe群 (2 ppm Fe食にferric citrateとしての鉄を100ppm添加。TD 92118, Teklad)。飼料は全群に同量ずつpair feedingした。発育に応じ、餌の投与量は漸増したが、飼育3週目から20 g/匹/日の一定とした。水は脱イオン水を自由に摂取させた。ラットは1ケージに2~3匹ずつ飼育し、室温及び湿度は約23°C及び55%に保ち、明暗は12時間おきに切り替えた。約14週目頃、sodium-pentobarbitalの腹腔内注入 (5 mg/100 g body weight)により麻酔したラットの後肢 (ふくらはぎ部) における高エネルギーリン酸含有を<sup>31</sup>P-核磁気共鳴 (NMR) 装置 (大塚電子製、BEM 170/200) を用いて測定した。詳細は平成4年度の報告書(9)で説明したので省略する。

その後、ヘパリンコーティングしたシリンジに頸静脈より採血し、血液自動分析装置 (日本テクニコン社製、H-1)を用い、Hb濃度及びヘマトクリット値を分析した。又、ヒラメ筋を採取し、湿重量測定後、片方は175mMKC1バッファー中でホモジナイズした。その後、succinate dehydrogenase (SDH, 10)、cytochrome oxidase (CO, 11)、lactate dehydrogenase (LDH, 12)、citrate synthase (CS, 13)、β-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HAD, 14)、creatine kinase (CK, 15) それにタンパク質(16)を測定した。又、他方のヒラメ筋は、コルク上にOCT compoundを用い直立させ、液体窒素で冷やしたイソペンタン中で瞬間凍結した。その後、クライオスタット (-20°C) で20 μm厚の横断切片を作成し、β-受容体の最大総合能 (Bmax) 及び親和性 (Kd)をautoradiographyを用いて分析した。分析法については他に(17)述べたので省略する。各群間の有意差検定にはANOVA及びStudent t-testを用い、p < 0.05レベルで有意とした。

## 結果及び考察

Table 1に示されるように、コントロール群 (100ppm Fe) の $13.6 \pm 0.5 \text{ g}/100\text{ml}$  に比べて、6 ppm Feの鉄欠乏食投与で血中Hb濃度は $5.0 \pm 0.2 \text{ g}/100\text{ml}$ と有意に減少した ( $p < 0.001$ )。2 ppm Fe食では貧血が更に進行し、Hbレベルは $3.4 \pm 0.1 \text{ g}/100\text{ml}$  と6 ppm Fe群よりも低値であった ( $p < 0.001$ )。ヘマトクリット値にも似たような

傾向が認められたが、6及び2 ppm Fe群間の差は有意ではなかった。

NMRによる分析結果によると、貧血は進行しても6 ppm Fe食では高エネルギーリン酸レベルは正常に維持された (Table 2)。しかしながら、2 ppm Fe食では特にクレアチンリン酸 (PCr)が顕著に減少した。相対的PCrレベルで示すPCr/(Pi+PCr)比は100及び6 ppm Fe群よりも有意に低値であった ( $p < 0.001$ )。安静時の高エネルギーリン酸値は生化学的分析によっても6 ppm Fe食では変化しない(18)。しかし、2 ppm Fe食によるPCrレベルの減少は生化学的分析によっても確認されている(1)。それに対し、無機リン酸 (Pi)含有量は上昇するので(1)、本研究でも、2 ppm Fe群のPi/PCr比は他の2群の値よりも顕著に高値であった ( $p < 0.001$ )。アデノシン・3・リン酸 (ATP) レベルは2 ppm Fe食で変化しない(1)。しかし、PCr値の減少により2 ppm Fe群のPCr/Total ATP比は他の2群より低い傾向にあり、特に6 ppm Fe群に比しては有意な低値が得られた ( $p < 0.05$ )。pHも2 ppm Fe食により低下する傾向が認められたが、統計的な有意性を得るには至らなかった。

ヒラメ筋における酵素活性値はTable 3に示してある。鉄含有酵素であるSDHとCOは共に鉄欠乏により低下した。CO活性には6及び2 ppm Fe群間に差はなかったが、湿重量当たりのSDH活性は6 ppmより2 ppm Fe群が更に低かった ( $p < 0.01$ )。非鉄含有のミトコンドリア・マトリックス酵素であるCS及びHADは、6 ppm Fe食では、変化しなかったが、2 ppm Fe食によりコントロール値よりもむしろ上昇した。筋中高エネルギーリン酸レベルと同様にこれらも、我々の以前の報告(1,18)と同じ傾向を示す結果である。LDHは6及び2 ppm Fe食で、共にコントロールの約2倍に活性化されたが ( $p < 0.001$ )、両鉄欠乏食群間には差は認められなかった。CK活性は、2 ppm Fe食が低い傾向にあり、タンパク質当たりの比活性は、6 ppm Fe群より有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

Autoradiographyにより得られた $\beta$ -受容体の結合能を示すsaturation curveには顕著な鉄欠乏の影響が見られた (Fig. 1)。100ppm Fe群に比べて、鉄欠乏の強度に応じ結合量が低下していることがわかる。 $\beta$ -受容体のBmaxは鉄欠乏で減少した (Table 4,  $p < 0.001$ )。ところが、Kdには有意な変化は認められなかった。従って、Bmaxの減少は受容体の親和性の低下ではなく、数の減少に起因したものであ

ることがわかる。尚、Bmaxは6 ppm Fe群よりも2 ppm Fe群が更に低く( $p < 0.001$ )、鉄欠乏の程度に応じて影響されることが示唆される。 $\beta$ -受容体の分布は速筋より遅筋が多く(7)、しかも同一筋においてtype IIよりもtype I fiberのほうが3倍も高いことが知られている(8)。従って、 $\beta$ -受容体はミトコンドリア数またはその酵素活性などと正の相関を有しながら存在することが示唆されている。

しかし、本研究の結果によると、 $\beta$ -受容体数の変化は、LDH及びCKのみならずミトコンドリア酵素でもCS及びHADの変化パターンとは全く異なるものであった。Martinら(8)によってもトレーニングによりヒト骨格筋のCS活性は上昇したが、 $\beta$ -受容体数は変わらなかったという結果が得られている。しかし、SDHやCOの比活性とは似たようなパターンで変化したが、中でもSDHと類似していた。骨格筋における $\beta$ -受容体の役割等はよく理解されていないが、SDHとは何らかの関係があることが示唆されよう。

#### まとめ

ラットにおける鉄欠乏が、ヒラメ筋の $\beta$ -受容体に及ぼす影響及びそのメカニズムを検討した。血中Hb濃度が約5 g/100mlの貧血を起こす程度の鉄欠乏に伴い、Bmaxが低下した。平均Hb濃度が3.4 g/100mlに低下すると、Bmaxは更に減少した。しかし、受容体の親和性は変わらなかったため、Bmaxの低下は受容体数の減少によって起きたことが示唆された。又、 $\beta$ -受容体の分布はミトコンドリア数又はその酵素活性とは正の相関があると言われているが、マトリックス酵素と全く関係がなく、鉄含有の酵素活性(特にSDH)との相関が高いことがわかった。

#### 参考文献

1. Ohira, Y., L.-J. Cartier, M. Chen, and J.O. Holloszy. Induction of an increase in mitochondrial matrix enzymes in muscle of iron-deficient rats. *Am. J. Physiol.* 253 (CellPhysiol. 22): C639-C644, 1987.
2. Ohira, M. and Y. Ohira. Effects of exposure to cold on metabolic characteristics in gastrocnemius muscle of frog (*Rana pipiens*). *J. Physiol.* (Lond

on) 395 : 589-595, 1988.

3. Ohira, Y., M. Kanzaki, and C.-S. Chen. Intramitochondrial inclusions caused by depletion of creatine in rat skeletal muscles. *Jpn. J. Physiol.* 38 : 159-166, 1988.

4. Ohira, Y., T. Wakatsuki, N. Inoue, K. Nakamura, T. Asakura, K. Ikeda, T. Tomiyoshi, and M. Nakajoh. Non-exercise-related stimulation of mitochondrial protein synthesis in creatine depleted rats. In "Integration of Medical and Sports Sciences", vol. 37, ed. by Y. Sato, J. Poortmans, I. Hashimoto, and Y. Oshida, Karger, Basel, pp. 318-323, 1992.

5. Ren, J.-M., C.F. Semenkovich, and J.O. Holloszy. Adaptation of muscle to creatine depletion : effect on GLUT-4 glucose transporter expression. *Am. J. Physiol.* 264 (CellPhysiol. 33): C146-C150, 1993.

6. Shoubridge, E. A., R. A. J. Challiss, D. J. Hayes, and G. K. Radda. Biochemical adaptation in the skeletal muscle of rats depleted of creatine with the substrate analogue  $\beta$ -guanidinopropionic acid. *Biochem. J.* 232 : 125-131, 1985.

7. Williams, R. S., M. G. Caron, and K. Daniel. Skeletal muscle  $\beta$ -adrenergic receptors : variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* 246 (Endocrinol. Metab. 9): E160-E167, 1984.

8. Martin, W. H., III, A. R. Coggan, R. J. Spina, and J. E. Saffitz. Effects of fiber type and training on  $\beta$ -adrenoceptor density in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metab. 20): E736-E742, 1989.

9. 大平充宣、刈谷文彦、安井渉、開発健一、菅原聡子、小柳浩二、小林昇、萩田太、田中美智子、黒田善雄。鉄欠乏及び貧血の程度が筋の代謝・収縮特性及び全身運動能力に及ぼす影響 — 強度の鉄欠乏が筋及び脳の代謝に及ぼす影響。平成4年度牛乳栄養学術研究会委託研究報告書、牛乳・乳製品健康づくり委員会、全国牛乳普及協会、pp. 199-208、1993。

10. Singer, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline,

- and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. *Methods Biochem. Anal.* 22 : 123-175, 1974.
11. Wharton, D.C. and A. Tzagoloff. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* 10 : 245-250, 1967.
  12. Pesce, A., R.H. McKay, F. Stolzenbach, R.D. Cahn, and N.O. Kaplan. Comparative enzymology of LDH. *J. Biol. Chem.* 239 : 1753-1761, 1964.
  13. Srere, P.A. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13 : 3-5, 1969.
  14. Winder, W.W., K.M. Baldwin, and J.O. Holloszy. Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscle : adaptation to exercise. *Eur. J. Biochem.* 47 : 461-467, 1974.
  15. Oscai, L.B. and J.O. Holloszy. Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. *J. Biol. Chem.* 246 : 6968-6972, 1971.
  16. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
  17. Ohira, Y., K. Saito, T. Wakatsuki, W. Yasui, T. Suetsugu, K. Nakamura, H. Tanaka, and T. Asakura. Responses of  $\beta$ -adrenoceptor in rat soleus to phosphorus compound levels and/or unloading. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, In press.
  18. Cartier, L.-J., Y. Ohira, M. Chen, R.W. Cuddihee, and J.O. Holloszy. Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 261 : 13827-13832, 1986.

Table 1

## Hemoglobin and hematocrit levels

	100 ppm Fe (n=8)	6 ppm Fe (n=8)	2 ppm Fe (n=8)
Hemoglobin (g/100ml)	13.6 ± 0.5	5.0 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Hematocrit (%)	40.9 ± 1.6	15.0 ± 0.9	14.1 ± 1.3

Mean±SEM. \*\*\*: p<0.001 vs. 100 ppm Fe group, and †††: p<0.001 vs. 6 ppm Fe group.

Table 2

Results of <sup>31</sup>P-NMR analyses

	100 ppm Fe (n=7)	6 ppm Fe (n=7)	2 ppm Fe (n=5)
Pi/PCr	93 ± 13	98 ± 15	226 ± 22
PCr/(Pi+PCr)	916 ± 11	912 ± 12	817 ± 15
PCr/Total ATP	1,868 ± 176	1,840 ± 87	1540 ± 41
pH	7.11 ± 0.10	7.28 ± 0.09	6.95 ± 0.06

Mean±SEM. Pi: inorganic phosphate, PCr: phosphocreatine, and ATP: adenosine triphosphate. \*\*\*: p<0.001 vs. 100 ppm Fe group, and †: p<0.05 and †††: p<0.001 vs. 6 ppm Fe group.

Table 3

## Enzyme activities in soleus muscle

	100 ppm Fe (n=8)	6 ppm Fe (n=6)	2 ppm Fe (n=9)
SDH ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	14.2 $\pm$ 3.1	4.1 $\pm$ 0.4 **	2.9 $\pm$ 0.3 ***, ††
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	90.7 $\pm$ 17.8	31.5 $\pm$ 5.5 **	21.0 $\pm$ 2.2 ***
CO ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	27.2 $\pm$ 3.1	12.5 $\pm$ 0.5 ***	14.5 $\pm$ 1.4 **
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	185.3 $\pm$ 22.9	97.2 $\pm$ 9.6 **	103.1 $\pm$ 11.9 ***
CS ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	23.9 $\pm$ 0.5	24.5 $\pm$ 0.3	29.1 $\pm$ 0.6 ***, †††
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	169.0 $\pm$ 12.5	186.0 $\pm$ 14.0	199.8 $\pm$ 2.2 *
HAD ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	27.7 $\pm$ 1.4	26.3 $\pm$ 2.1	38.7 $\pm$ 3.0 **, ††
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	201.5 $\pm$ 27.8	205.1 $\pm$ 13.2	265.6 $\pm$ 21.7
LDH ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	115.6 $\pm$ 11.7	216.1 $\pm$ 14.9 ***	206.6 $\pm$ 17.4 ***
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	810.6 $\pm$ 98.0	1674.4 $\pm$ 185.5 ***	1451.8 $\pm$ 131.2 ***
CK ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ wet wt)	137.9 $\pm$ 9.6	145.6 $\pm$ 6.6	126.1 $\pm$ 8.3 ††
( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein)	995.1 $\pm$ 107.2	1076.8 $\pm$ 72.3	860.8 $\pm$ 52.0

Mean $\pm$ SEM. SDH: succinate dehydrogenase, CO: cytochrome oxidase, CS: citrate synthase, HAD:  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, LDH: lactate dehydrogenase, and CK: creatine kinase. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, and \*\*\*: p<0.001 vs. 100 ppm Fe group, and ††: p<0.01 and †††: p<0.001 vs. 6 ppm Fe group.

Table 4

The maximum binding capacity and dissociation constant of  $\beta$ -adrenoceptors in soleus

	100 ppm Fe (n=4)	6 ppm Fe (n=4)	2 ppm Fe (n=4)
Bmax (fmol/mg protein)	130.6 $\pm$ 1.5	99.8 $\pm$ 4.4 ***	52.9 $\pm$ 3.6 ***, †††
Kd (pM)	31.4 $\pm$ 0.4	32.8 $\pm$ 1.5	36.0 $\pm$ 2.2

Mean $\pm$ SEM. Bmax: maximum binding capacity and Kd: dissociation constant. \*\*\*: p<0.001 vs. 100 ppm Fe group, and †††: p<0.001 vs. 6 ppm Fe group.

## 図の説明

ラットヒラメ筋における $\beta$ -受容体の結合パターン。



Fig. 1 Saturation curve

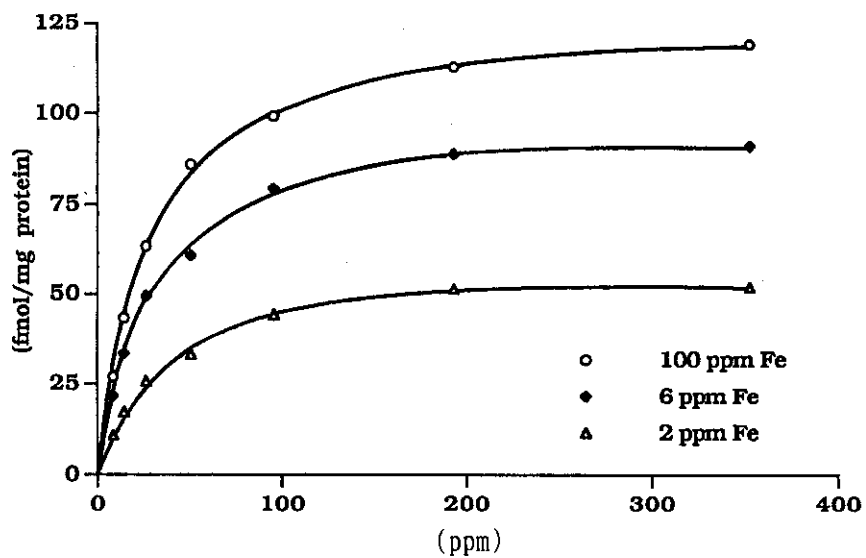


Fig. 2 Scatchard plot

